

УДК 579:636

Даниленко С.Г., к.т.н., © (svet1973@gmail.com)
Інститут продовольчих ресурсів НААН, м. Київ

ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ *LACTOBACILLUS PARACASEI* SSP. *PARACASEI* ТА *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* SUBSP. *SUIS*

Вивчено культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості двох штамі в *L. paracasei* ssp. *paracasei* та *B. longum* subsp. *suis*, які є перспективними як основа препаратів для підвищення продуктивності птиці та поросят.

Ключові слова: біфідобактерії, лактобактерії, *L. paracasei* ssp. *paracasei* та *B. longum* subsp. *suis*, пробіотик, птиця, поросята

Постановка проблеми. До складу пробіотиків переважно залучають молочнокислі бактерії, виділені з організму людей або тварин, а також із спеціальних харчових продуктів, які застосовують у медицині та ветеринарії. Сьогодні молочнокислі бактерії все частіше призначаються у терапії дисбіозів, для компенсації ферментативної недостатності та імунокорекції, а також для профілактики і лікування захворювань інфекційної природи. Важливою характеристикою цих мікроорганізмів є цукролітичний тип метаболізму. У процесі життєдіяльності вони утворюють органічні кислоти, що призводить до зниження рН середовища кишечника і перешкоджає розмноженню патогенної, гнильної й газоутворювальної мікрофлори у кишечнику. Лактобактерії позитивно впливають на утворення деяких ферментів і вітамінів, що сприяють травленню, продукують антибактеріальні сполуки, активізують відновлення нормальної кишкової мікрофлори після діареї, спричиненої терапією антибіотиками й радіотерапією, нормалізують рівень холестерину в крові, стимулюють імунні функції, пригнічують бактеріальні інфекції, а також спрощують виведення канцерогенів.

Завдяки цьому молочнокислі та біфідобактерії сьогодні широко застосовують при виготовленні пробіотичних препаратів як для людини, так і для тварин та використовують у харчовій промисловості та кормовиробництві [1-3].

Практичне використання лактобацил обумовлено їхньою високою антагоністичною активністю до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, здатністю продукувати вітаміни та інші біологічно активні речовини, стимулювати імунну відповідь макроорганізму [3, 4].

Мета і завдання дослідження. Незважаючи на значні досягнення мікробіологів, кількість істинних пробіотиків незначна, тому і нині триває пошук нових високоактивних штамів мікроорганізмів, що є перспективними для створення пробіотиків та препаратів для консервування кормів. Нами із

кишківника сільськогосподарської птиці було вилучено два штами бактерій *L. paracasei ssp. paracasei* та *B. longum subsp. suis*. Для того, щоб оцінити їхню промислову перспективу як пробіотиків, метою даних досліджень було вивчення їхніх біологічних та технологічних властивостей.

Матеріал і методика дослідження. Об'єктами досліджень були культури мікроорганізмів *L. paracasei ssp. Paracasei*, виділений із птиці, та *B. longum subsp. suis* із кишківника поросяти. Властивості цих ізолятів оцінювали за такими показниками: морфологія росту на твердих та рідких поживних середовищах [5], морфологія клітин методом мікроскопії [7], молокозсідальна [5], нітратредукувальна [5], амілазна [6] активності, відношення до різних концентрацій NaCl [5], діапазон температури росту [5], спектр зброджуваних вуглеводів [5,6], антагоністична активність [8], антибіотикорезистентність [8]. Антагоністичну активність штамів досліджували *in vitro* за методом лунок. Як тест-культури використовували умовно-патогенні мікроорганізми: *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. vulgaris* ГІСК 160209, *E. coli* ГІСК 240111, *E. coli* 113, *E. coli* 0111, *S. aureus* ГІСК 049065.

Результати досліджень та їх обговорення. Дослідження культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей штаму *L. paracasei ssp. paracasei*, показало, що це грампозитивні палички, величиною 0,5-0,6 x 1-3 мкм, нерухомі, не утворюють спори, поодинокі або розташовані у ланцюжках по 4-8 клітин. Частина клітин має чітко виражену полярну зернистість. В агарі з гідролізованим молоком (ГА) утворюються колонії білого кольору розміром не більше 1,0 мм у діаметрі у вигляді "човників"; на поверхні агару – дрібні, білуваті, пласкі колонії. В гідролізованому бульйоні та рідкому середовищі МРС культура росте з утворенням рівномірної каламуті та дрібнодисперсного осаду на дні пробірки. Оптимальна температура росту - 30 °С. Штам ферментує рибозу, галактозу, глюкозу, фруктозу, маннозу, маніт, трегалозу, не ферментує сахарозу, рамному, ксилозу, гліцерин, арабінозу, сорбіт, мальтозу.

Кількість основних метаболітів діацетилута ацетоїну склала, 23 мг% 0,58 мг%. За культивування у середовищі на основі м'ясної води штам накопичував 90,2 мкг/см³ вільних амінокислот, у тому числі й незамінних.

Штам *L. paracasei ssp. paracasei* каталазонегативний, володіє нітритредукувальною активністю, амілазною активністю не володіє, газ з глюкози не утворює, індол і сірководень не продукує. У разі внесення 3% культури в молоко за температури 30 °С молокозсідальна активність штаму становить 18 год, за температури 37 °С – 14 год; гранична кислотність –160 °Т. Росте у гідролізованому молоці з 6,5% NaCl; не росте у гідролізованому молоці з 40% жовчі та МПБ з рН 9,6; відновлює лакмусове молоко, не утворює аміаку з аргініну.

При вивченні культурально-морфологічних властивостей бактерії *B. longum subsp. suis* встановлено, що це грампозитивні палички, нерухомі, не утворюють спори. Клітини прямі або трохи вигнуті, на кінцях мають дещо інтенсивніше забарвлені гранули. Розміри клітин варіюють від 0,7 до 0,9 мкм ширини та 1,0-2,0 мкм довжини. Розташовуються або поодинокі, або у вигляді

невеликих скупчень, зрідка у коротких ланцюжках. У агаризованому гідролізатно-молочному середовищі штамп утворює колонії білого кольору біля 1,5 мм у діаметрі у вигляді “гречаних” зерен або дисків. У рідкому середовищі Блаурок за 20-24 год росту утворює рівномірну каламуть та крихкий нещільний осад на дні та стінках пробірки з чіткою зоною відсутності росту культури до 1,0 см від поверхні середовища, що є характерною ознакою для анаеробів.

Оптимальна температура росту – 38-40⁰С, штамп не гідролізує желатин, не утворює газ і вуглеводів, не відновлює нітриту, не утворює аміак з аргініну. Штамп ферментує рамнозу, декстрин, ксилолу, мелібіозу, сахарозу, галактозу, мальтозу, арабінозу, рафінозу, не ферментує рибозу, целобіозу, меліцитозу, сорбіт, тригалозу, маніт .

Встановлено, що досліджені штами *L. paracasei ssp. paracasei* та *B. longum subsp. suis* розвиваються у діапазоні концентрації NaCl від 1,0 % до 6,5 %. Лактобактерії були стійкішими до цього чинника і за 5,0 активність росту їх знизилась на 22%, тоді як біфідобактерій – на 32 % від рівня контролю (середовище без додавання солі). Водночас збільшення концентрації до 7% NaCl було згубним для обох штамів. В умовах осмотичного стресу, обумовленого високою концентрацією лактози (4%), фізіологічна активність (вихід біомаси, рН, титрова кислотність) і життєздатність біфідобактерій не відрізнялись від контрольних показників, тоді як для *L. paracasei ssp. paracasei* спостерігали зниження життєздатності на 52 %. Подальше підвищення концентрації лактози негативно впливало на життєздатність біфідобактерій.

Одним із важливих критеріїв селекції бактерій-пробіотиків є їхня стійкість до агресивних метаболітів травної системи (шлункового соку і жовчі) та колонізаційна резистентність. Було досліджено вплив шлункового соку та жовчних солей на розвиток взятих до досліду штамів лакто- і біфідобактерій.

Стійкішим до шлункового соку виявився штамп біфідобактерій. Їхня чисельність відразу знизилася лише на 2,3 –13 % від вихідної. При цьому істотних розбіжностей у чисельності клітин, що вижили, як для окремих культур, так і за рН 3 і рН 2 не спостерігали.

Штамп *L. paracasei ssp. paracasei* виявився стійкішим до шлункового соку. Він зберігав чисельність своєї популяції на одному рівні протягом 5 год за обох значень рН 2 і рН 3. Швидкість відмирання його клітин була досить низькою – близько 0,2 год⁻¹.

Що стосується *B. longum subsp. suis*, то помітне зниження чисельності клітин спостерігали між 3 та 5 годиною експозиції. Штамп у варіанті з рН 3 протягом експерименту втратив лише 2% від вихідної кількості (швидкість відмирання також була незначною $\mu = -0,2$ год⁻¹).

У жорсткіших умовах (рН 2) відмирання клітин було істотнішим, однак його темпи були стриманішими, ніж у молочнокислих бактерій, і за 5 годин кількість втрачених клітин коливалася від 12 до 37 %.

Реакцію культур на жовчні кислоти визначали за культивування у рідкому поживному середовищі MRS і з додаванням 0,1-2,0 % препарату сухої

жовчі великої рогатої худоби. Контролем служив варіант без внесення жовчі в середовище культивування.

Встановлено, що всі досліджувані штами здатні рости у присутності жовчних кислот за вмісту останніх до 0,5 %. За підвищення концентрації жовчних кислот спостерігали інгібування росту бактерій. У середовищах з 2,0 % жовчі, приріст біомаси знижувався на 24% *B. longum subsp. suis* та на 71% для *L. paracasei ssp. paracasei* порівняно з контролем.

Найважливішою характеристикою штамів пробіотичних бактерій є антагоністична дія щодо хвороботворної мікрофлори.

In vitro досліджена антагоністична активність штамів стосовно музейних культур *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. vulgaris* ГІСК 160209, *E. coli* ГІСК 240111, *E. coli* 113, *E. coli* 0111, *S. aureus* ГІСК 049065.

Виявлено, що взяті до досліду штами молочнокислих та біфідобактерій виявляли різну за ступенем антагоністичну дію відносно тест-культур (табл. 1).

Таблиця 1

Антагоністична активність *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* та *Bifidobacterium longum subsp. suis* (метод лунок, розмір зони пригнічення росту тест-культури, мм)

Штам	Тест-культури					
	<i>E. coli</i> 113	<i>E. coli</i> O111	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i> ГІСК 240111	<i>S. aureus</i>	<i>P. vulgaris</i>
<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	18±2	14±2	19±1	14±2	18±1	15±3
<i>B. longum subsp. suis</i>	16±2	16±2	18±2	18±2	16±1	12±2

Найвищу активність спостерігали для штаму *L. paracasei ssp. paracasei* – діаметр зони лізису тест-культур становив 18,0 мм. Найвразливішими були штами *S. aureus*, *P. vulgaris* та *E. coli* – розмір зони затримки росту коливався в межах (12-18) мм, (11-15) мм, (9-18) мм відповідно. Біфідобактерії за цих умов майже не відрізнялись від лактобацил, за винятком впливу на *P. vulgaris* та *E. coli* ГІСК 240111.

Враховуючи той факт, що у ветеринарії для лікування сільськогосподарських тварин широко застосовують антибіотики, ми вивчили чутливість *L. paracasei ssp. paracasei* та *B. longum subsp. suis* до 27 антибіотиків, що належать до 13 груп антимікробних речовин (пеніциліни, цефалоспорини, карбапеніми, аміноглікозиди, тетрацикліни, азаліди, лінкозаміни, поліміксини і фторхінололи). Для дослідження було використано диско-дифузний метод. Зони затримки росту бактеріальної культури вимірювали через 24 год вирощування в анаеробних умовах за 37 °С (табл. 2).

Таблиця 2

Антибіотикостійкість штамів *B. longum subsp. suis* та *L. paracasei ssp. paracasei*

№ п/п	Антибіотики	Штами/стійкість до антибіотику ^е		№ п/п	Антибіотики	Штами/стійкість до антибіотику ^е	
		<i>B. longum subsp. suis</i>	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>			<i>B. longum subsp. suis</i>	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>
	Група цефалоспоринів			Група тетрациклінів			
1.	Цефтриаксон	14	28	16	Доксидиклін	20	26
2.	Цефазолін	0	22	17	Тетрациклін	14	21
3.	Цефтиомакс			Група агзаміцинів			
4.	Цефепим	0	16	18	Рифампіцин	8	24
5.	Цефамексин	10	16	Група нітрофуранів			
6	Цефоперазон	14	-	19	Фурадонін	0	26
	Група аміноглікозидів			Група карбапенемів			
7	Гентамицин	0	14	20	Меропенем	24	27
8	Стрептоміцин	16	18	Група хлорамфеніколу			
9	Амікацин	0	н.в	21	Левоміцетин	18	26
10	Неомицин	0	н.в	підклас азалідів			
11	Канамицин	0	14	22	Азитроміцин	10	
				23	Еритроміцин	10	28
	Ряд фторхінолів			Протигрибкові засоби			
12	Ципрофлоксацин	16	17	24	Итраконазол	0	0
13	Офлоксацин	12	21	Поліміксини			
				25	Поліміксин,	0	0
				Ряд лінкозаміни			
	Група пеніцилінів			26	Лінкоміцин	20	24
14	Амоксицилін	12	20	27	Клинзаміцин	12	н.в
15	Ампіцилін	0	26				

- н.в. — не визначали.

Отримані дані свідчать про високу чутливість досліджуваних штамів до широкого ряду груп антибіотиків, особливо до таких як пеніциліни, азалідів, лінкозамінів, цефалоспоринів, хлорфеніколів та карбопенемів. Поряд з цим вони проявили стійкість до аміноглікозидів, поліміксинів і фторхінолоамів. Слід зауважити, що молочнокислі бактерії на відміну від біфідобактерій, були стійкішими до цефалоспоринів, аміноглікозидів, лінкозамінів.

Висновки

Встановлено, що досліджені штами *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* та *Bifidobacterium longum subsp. suis* характеризуються високим рівнем біологічної активності та є перспективними для залучення до складу

пробиотиків. Штами мають необхідний для промислового використання потенціал.

Література

1. Смирнов В.В. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов /В.В. Смирнов, Н.К. Коваленко, В.С. Подгорский, И.Б. Сорокулова //Мікробіол. журн. – 2002. – Т. 64, № 4. – С. 62-80.
2. Денисенко В.В. Молочнокислые бактерии – основа препаратов пробиотического действия /Денисенко В.В., Найдено И.А. //Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. научн. тр. – Минск: изд. И.П. Логвинов, 2007. – Т. 1. – С. 233-241.
3. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл /Глушанова Н.А. //Бюл. сибирской медицины. – 2003. – №. 4. – С. 50-58.
4. Квасников Е.И. Место и значение молочнокислых бактерий в биосфере. Эскиз /Е.И. Квасников //Мікробіол. журн. – 1992. – Т. 54, № 5. – С. 3-10.
5. Квасников Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования /Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – М.: Наука, 1975. – 392 с.
6. Методы общей бактериологии /под ред. Ф. Герхардта и др.; пер. с англ.: в 3 т. – М.: Мир, 1983 – Т. 3. – 1984. – 264 с.
7. Методы общей бактериологии /под ред. Ф. Герхардта и др.; пер. с англ.: в 3 т. – М.: Мир, 1983. –Т. 1. – 1983. – 536 с.
8. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: учеб. для студ. биол. спец. ун-тов /Н.С. Егоров. – [4-е изд., испр. и доп.]. – М.: Высш. шк., 1986. – 448 с.

Summary

S.Danylenko

PROPERTIES OF MICROORGANISMS STRAINS *L. PARACASEI* SSP. *PARACASEI* AND *B. LONGUM* SUBSP. *SUIS*

*It was observed cultural-morphological and physiology-biochemical properties of microorganisms *L. paracasei* ssp. *paracasei* and *B. longum* subsp. *suis*, which can be used as a basis in preparations for productivity increasing of poultry and pork*

Key words: *bifidobacterium, lactobacillus, B. longum subsp. suis, L. paracasei ssp. paracasei, probiotic, poultry, pork.*

Рецензент – к.вет.н., доцент Калініна О.С.